IMMUNOPREP™
試薬システム
全血溶血試薬

REF 7546946
REF 7546999

PN 7507950-N

用途
IMMUNOPREP試薬システムは、フローサイトメーターによる免疫蛍光測定のために全血から白血球を調製する際に使用する研究用試薬です。IMMUNOPREP 試薬システムは フローサイトメーターによる免疫蛍光測定のために全血から白血球を調製する際に使用する研究・検査用試薬です。IMMUNOPREP 試薬システム (製品番号 7546946) は、COULTER® Q-PREP™ ワークステーション用[1]、IMMUNOPREP 試薬システム (製品番号 7546999) は、COULTER MULTI-Q-PREP™ ワークステーション、COULTER TQ-Prep™ ワークステーション[2,3]、および FP 1000用です。

概要および解説
ヒト白血球をその細胞表面抗原の発現に基づいて分類する方法は、これまで診断および予後判定のための貴重な情報を提供してきました。[4,5] 免疫蛍光に使用する白血球を分離する従来の方法には、全血溶血法や濃度勾配分離法があります。[6] 市販の試薬を用いたこれらの方法では検体から未反応の抗体や細胞残渣を除去するために洗浄が必要で、混合、攪拌、遠心分離で繰り返し加わる傷害により悪性腫瘍細胞や"活性化"細胞の選択的な崩壊がみられます。さらに、容器への付着や不完全な遠心分離による特定の細胞の喪失が起こることがあります。[7] ほとんどの方法は、人手や緻密な技術がもとめられ、大量の検査をこなすことは困難でした。1987年、IMMUNOPREP試薬システムは細胞表面形質の免疫学的検索のための迅速で自動化された全血調製システムとして登場し、今日ではフローサイトメーターを用いたさまざまな検査研究に利用されています。[8,9]

原理
IMMUNOPREP試薬システムは、迅速、穏やかで洗浄を必要としない赤血球溶血システムで、白血球の形態や表面構造を保存します。[8] 洗浄や遠心分離による細胞の喪失を防げます。このような過程が必要でなくなることで全作業時間が大幅に短縮されます。さらに時間の短縮が可能となり、至急の検査依存にも即座に対応できます。

IMMUNOPREP試薬システムは、3つの試薬の組み合わせからなり、自動サンプル調製ワークステーション専用のシステムです。構成試薬は、

IMMUNOPREP A（赤血球溶血試薬）、
IMMUNOPREP B（白血球スタビライザー）
IMMUNOPREP C（細胞膜固定液）です。

試薬
IMMUNOPREP試薬システム (製品番号 7546946)：
COULTER Q-PREP ワークステーション用
IMMUNOPREP試薬システム (製品番号 7546999)：
COULTER MULTI-Q-PREP ワークステーション、
COULTER TQ-Prep ワークステーション、
および FP 1000用。

試薬は、それぞれのサンプル調製ワークステーションに合わせて包装されています。

IMMUNOPREP試薬システム

試薬	Q-PREP	TQ-Prep/ MULTI-Q-PREP/FP 1000
IMMUNOPREP A	70 mL	215 mL
IMMUNOPREP B	32 mL	95 mL
IMMUNOPREP C	14 mL	36 mL

試薬内容
IMMUNOPREP A
- ギ酸. . . . . 1.2 mL/L
- スタビライザー

IMMUNOPREP B
- 炭酸ナトリウム . . . . 6.0 g/L
- 塩化ナトリウム . . . . .14.5 g/L
- 硫酸ナトリウム . . . . .31.3 g/L
- **スタビライザー**

IMMUNOPREP C
- パラホルムアルデヒド. . . . . .10.0 g/L
- バッファアー

警告
1. IMMUNOPREP Cは1%ホルムアルデヒドを含んでいます。ホルムアルデヒドは非可逆的影響を及ぼすことがありますので、皮膚や目に触れないよう注意ください。蒸気を吸い込まないでください。手袋やゴーグルなど、適切な安全用具を着用してください。
2. 組織や検体およびそれらに触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適当な表示や処理をして廃棄してください。
3. ピペットを口で吸引してはいけません。皮膚や粘膜に検体を接触させないでください。
4. バイアルやキットのラベルに記載の有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
5. IMMUNOPREP試薬は、キットになっている試薬のセットを指定の機器のみに使用してください。
6. インキュベーションの時間および温度は指示どおりに設定しないと正確な結果が得られません。
7. 試薬が微生物で汚染されないよう注意してください。不正確な結果になることがあります。
8. 本誌薬を取り扱う時は、前臨床試験実施基準(GLP）に従ってください。
9. 皮膚に付着すると感作されることがあります。
10. 眼に入った場合、直ちに大量の水で洗い医師の指示を受けてください。
11. 防護用の適切な衣服、手袋、ゴーグル/顔面マスクを装着してください。
12. 事故が発生した場合、または気分が悪くなった場合は、直ちに医師の指示を受けてください（可能であればラベルを医師に見せてください）。

試薬の調製
調製は不要です。IMMUNOPREP試薬はボトルからそのまま使用してください。ワークステーションに取り付ける前に、ボトルを静かに転倒混和して攪拌してください。

貯法および安全性
本品は、室温（20～25℃）で保存してください。未開封の試薬は、キットのラベルに記載の有効期限まで安定です。開封した試薬ボトルは、ワークステーションに設置後30日間安定です。本品には、アジ化物は入っていません。本試薬は体内で分解され、光に対して感受性はありません。間違って凍結した場合は、室温で完全に溶解し、使用前にボトルを静かに転倒混和してください。空になったボトルはすぐに廃棄してください。

劣化の徴候
本試薬は透明な液体です。何らかの外観上の変化やコントロール検体の結果に大きな変動がみられた場合、また正常赤血球の溶血がうまく行われない場合は、本品の劣化が考えられます。そのような試薬は使用しないでください。

検体の採取と調製
注意：血液検体の安定性は極めて多様です。良好の溶血結果を得るためには、採血後、6時間以内に検査を開始してください。染色前の全血検体は、サンプル調製を始めるまで20～25℃に保ってください。冷蔵しないでください。

静脈穿刺により、適当な凝固剤（EDTAを推奨）を用いて無菌的に採血間管に静脈血を採取します。10真空採血管を使用する場合、抗凝固剤と血液の割合(1.5 mg/mL）が適切になる量まで血液を採取します。1項目ごとに全血100 µLが必要です。検体やコントロールの測定のほか希釈が必要な場合の自己（同一患者）血漿を確保するため、それぞれの患者から十分な量の血液を採取してください。各検査室で確立された検査方法を用いて各静脈血検体の白血球数と生存率を測定します。適切な白血球生存率は90%以上ですが、病的状態ではこの値を得られない場合もあります。

IMMUNOPREP試薬システムによる白血球準備の手順

キットの種類
IMMUNOPREP試薬システム（製品番号7546946）：
COULTER Q-PREPワークステーション用
IMMUNOPREP 試薬システム（製品番号 7546999）：
COULTER MULTI-Q-PREP ワークステーション、
COULTER TQ-Prep ワークステーションおよび
FP 1000 用

その他検査に必要なもの
COULTER Q-PREPワークステーション、
COULTER MULTI-Q-PREPワークステーション、
COULTER TQ-Prepワークステーション、または
FP 1000
CYTO-STAT®/COULTER CLONE®
モノクローナル抗体、
または相当品
CYTO-STAT/COULTER CLONEアイソタイプ
コントロール、または相当品
希釈用自己（同一患者）血漿（必要な場合）
ガラス製品用シリコン処理剤
（Prosil®-28、PCR, Inc.)
ガラス製試験管12 x 75 mm
抗凝固剤入り採血管（EDTAを推奨）
ピペット
マイクロピペッター
フローサイトメーター（COULTER EPICS™
XL-MCL™、XL™、FC 500）
細胞カウンター（COULTER STKS™、
または相当品）または血球計算盤

手順
1. 検体ごとに2本の12 x 75 mm試験管を用い、1本にモノクローナル抗体、他方にアイソタイプコントロールと示したラベルを貼付します。細胞数の調製やインキュベーション

時間など、試薬に関する詳しい情報についてはパッケージ内の使用説明書を参照してください。

2. ピペットを用いて抗凝固剤を加えた全血、100 µLを、適切なラベルを貼付した試験管の底の方に注入します。試験管の内部側面や上部に血液が付着しないようにしてください。

注記：白血球数が3,000〜10,000個/µLの範囲外である場合、適切な値になるよう調製する必要があります。希釈には自己（同一患者）血漿を使用してください。最適の細胞濃度については、それぞれのモノクローナル抗体の使用説明書を参照してください。

重要：試験管の側面や上部に付着した未溶血の赤血球は、最終的にサンプルに混入し、不正確な結果の原因になります。綿棒を使って試験管に付着した血液を拭き取ってください。

3. アイソタイプコントロール10 µL、CYTO-STAT/COULTER CLONEモノクローナル抗体10 µL、または使用するモノクローナル抗体の適切な量を加え、十分攪拌します。
4. 室温（20〜25℃）で約10分間インキュベーとします。インキュベーション条件については、モノクローナル抗体の使用説明書を参照してください。
5. 溶血操作を開始する前に、メーカーの指示にしたがってワークステーションを正しく起動してください。適切なワークステーション取扱説明書を参照してください。[1,2,3] Q-PREP を使用する場合はステップ 6、MULTI-Q-PREP を使用する場合はステップ 7、TQ-Prep を使用する場合はステップ 8、FP 1000 を使用する場合はステップ 11 へ進んでください。

6. Q-PREPを使用する場合

注記：前方散乱光（FALS）を狭い角度で測定するフローサイトメーターを用いて解析する場合、検体の入った試験管をワークステーションから取り外した後、試験管に0.5 mLの脱イオン水または蒸留水を加えてください。

a. 装置に試験管を取り付け、インキュベーション時間に応じて35または90秒サイクルボタンを押してください。装置のドアを閉め、測定を開始します。ステップ9に進んでください。

7. MULTI-Q-PREPを使用する場合

注記：前方散乱光（FALS）を狭い角度で測定するフローサイトメーターを用いて解析する場合、MULTI-Q-PREPスイッチをON（上側）にして脱イオン水または蒸留水を注入します。詳しくは、MULTI-Q-PREP取扱説明書を参照してください。[2]

a. カローセルに、時計回りに試験管をセットします。カローセルをMULTI-Q-PREPのインデックスユニットに載せ、カバーを閉めます。
b. RUNボタンを押して、自動測定を開始します。ステップ9に進んでください。

8. TQ-Prepを使用する場合

注記：前方散乱光（FALS）を狭い角度で測定するフローサイトメーターを用いて解析する場合、TQ-Prep-4-reagentモードを表示してください。詳しくは、TQ-Prep取扱説明書を参照してください。[3]

a. カローセルに、時計回りに試験管をセットします。カローセルをTQ-Prepのインデックスユニットに載せ、カバーを閉めます。
b. RUNボタンを押して、自動測定を開始します。ステップ9に進んでください。

9. 2時間以内にフローサイトメーターによる測定を開始する場合は、準備した検体は室温（20〜25℃）で保存できます。そうでない場合は、検体にカバーをして冷暗所（2〜8℃）で保存します。24時間以内に測定してください。
10. 検体をフローサイトメーターで解析します。フローサイトメーターの取扱説明書を参照してください。

11. FP 1000 を使用する場合

a. カローセルに、時計回りに試験管をセットします。カローセルを FP 1000 のユニットに載せます。詳しくは、FP 1000 取扱説明書を参照してください。[11]

重要: IMMUNOPREP 試薬キットは、FP 1000 を作動
する前に同じロットからプールされなければなりません。詳しくは、FP 1000 の取扱説明書を参照してください。

注記：前方散乱光（FALS）を狭い角度で測定するフローサイトメーターを使用する場合は、白血球の三分画（リンパ球、単球、顆粒球領域）を得るためにスレッショルド、前方散乱光のゲイン、側方散乱光のPMT電圧を調節する必要があります。

精度管理

すべての検体の赤血球の溶血状態を、調整後の試験管の目視による点検と散乱光のヒストグラムの解析により検討してください。溶血していないサンプルは混濁しています。溶血が不完全なサンプルでは、白血球とは異なる散乱光の集団が濃密に認められます。システム管理状態のチェックとして、測定結果が分かっている検体を未知の検体と一緒に処理、解析してください。

最適な結果を得るために、EPICS XL-MCLフローサイトメーターまたは相当する機器が散乱光や蛍光を適正に検知するよう調整、標準化されていること、蛍光コンペンセーションが設定されていることを確認してください。詳細は、フローサイトメーターの取扱説明書を参照してください。

結果

抗凝固剤としてEDTAを用いた健常者全血検体をCYTO-STAT/tetraCHROME™ CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/ CD3-PC5モノクローナル抗体およびIMMUNOPREP試薬システムを用いて染色、処理して得られた代表的な結果を図1〜4に示します。検体はCOULTER IsoFlow™シース液を用いてEPICS XL-MCLフローサイトメーターで分析しました。

図1.リンパ球（ゲートA）を同定するための側方散乱光と前方散乱光の2パラメーターヒストグラム

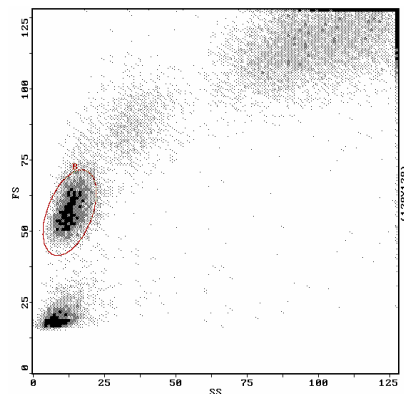



図2.リンパ球（ゲートA）を同定するためのCD45-FITCと側方散乱光の2パラメーターヒストグラム

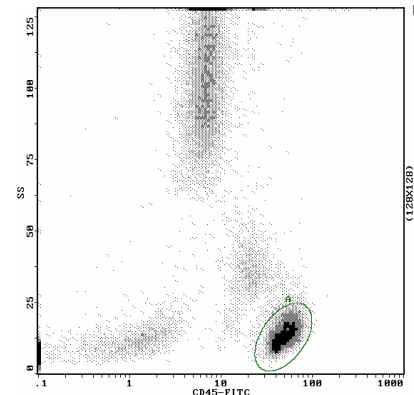



図3.リンパ球領域にゲートを設定しアイソタイプコントロールに基づいて設定したQuad Statsで解析したCD3-FITCとCD4-RD1の2パラメーターヒストグラム

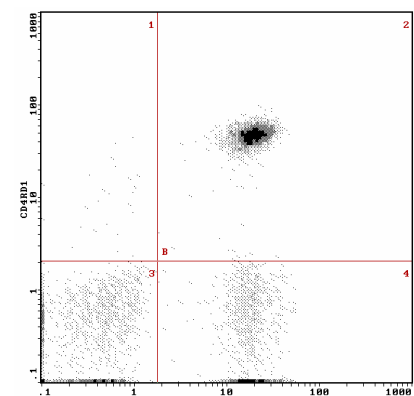
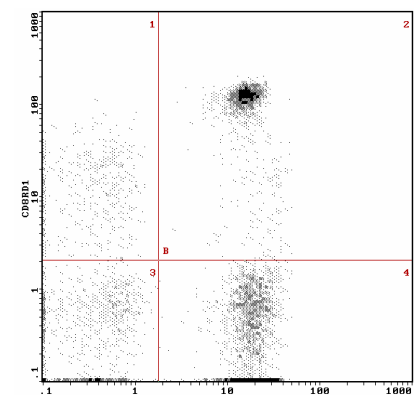



図4.リンパ球領域にゲートを設定しアイソタイプコントロールに基づいて設定したQuad Statsで解析したCD3-FITCとCD8-RD1の2パラメーターヒストグラム

測定上の限界

1. キットのラベルに記載の有効期限までに使用してください。
2. データは、健常者全血検体に基づいています。
3. 検体が混濁している場合、溶血は不完全です、ワークステーションに適合した正しい試薬が使用され混合されているか点検してください。重量キャリブレーションの手順については、Q-PREP, MULTI-Q-PREP、TQ-Prep、FP 1000 の各取扱説明書を参照してください。

4. 有核赤血球（NRBC）は完全に溶血しにくく、白血球の散乱光分画に混入することがあります。
5. 検査室における1キット当たりの実際の処理サンプル数は使用状況によって異なります。

注記：MULTI-Q-PREPを使用している場合、以下に示す使用例を参考にしてください。

使用例 A： 検体量が少ない検査。1日に2バッチ(5本の試験管を処理した後、早くとも30分以降に他の5本の試験管を処理)
使用例 B： 検体量が少ない検査。1日に1バッチ(1バッチで10本の試験管を処理)
使用例 C： 検体量が多い検査。1日に1キット使用(1キットすべてを使用、もしくは複数のキットを間隔をおかないで使用)

表1にIMMUNOPREP試薬システム1キット当たりの平均的な検体処理サイクル数、プライム回数、総サイクル数を示します。

表1.使用例A、B、Cにおけるサイクル数

	例A	例B	例C
検体処理	269	289	321
プライム*	52	29	1
合計	321	318	322

*MULTI-Q-PREPワークステーションの電源を入れた直後と、カローセル作動終了後30分を過ぎると行われる初動運転を指します。詳細はMULTI-Q-PREP取扱説明書を参照してください。

参考文献

1. COULTER Q-PREP Workstation Reference Manual, PN 4235825. Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.
2. COULTER MULTI-Q-PREP Workstation Reference Manual, COULTER PN 4237167, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.
3. COULTER TQ-Prep Workstation Reference Manual, PN 4237395, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.
4. Rose NR and Friedman H, eds. 1980. Manual of clinical immunology, 2d edition. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Guidelines for prophylaxis against pneumocystis carinii pneumonia for persons infected with human immunodeficiency virus. Center for Disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report 38 (S-5):1-9.
6. Mishell BB and Shiigi AM. 1980. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: WH Freeman and Co.
7. Caldwell CW and Taylor HM. 1986. A rapid no-wash technique for immunophenotypic analysis by flow cytometry. Am J Clin Path 86(5):600.
8. Barker JW. 1988. An innovative lymphocyte preparation system for flow cytometry. Am Clin Lab 7(7):32.
9. Kotylo PK, Baenzinger JC, Yoder MC, Engle WA and Bolinger CD. 1990. Rapid analysis of lymphocyte subsets in cord blood. Am J Clin Path 93(2):263-266.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards; Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; Approved Standard: 1991. NCCLS Document H3-A3.
11. FP 1000 Cell Preparation System Reference Manual, PN 623112, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.

品番

IMMUNOPREP試薬システム（製品番号 7546946）
IMMUNOPREP試薬システム（製品番号 7546999）

ご不明な点や製品の不具合に関しましては、最寄りのベックマン・コールター社のホットライン（800-526-7694、北米のみ）、または最寄りのベックマン・コールター代理店にご連絡ください。

商標

IMMUNOPREP 試薬システムの特許番号：5,030,554

製造元

Beckman Coulter, Inc.
4300 N. Harbor Blvd.
Fullerton, CA 92835
www.beckmancoulter.com

製造販売元:ベックマン·コールター株式会社
東京都江東区有明二丁目5番7号

EC REP

Beckman Coulter Ireland Inc.
Mervue Business Park,
Mervue, Galway,
Ireland (353 91 774068)

Printed in USA
Made in USA